

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**LUMINISCENČNÍ STANOVENÍ
CELKOVÉHO OBSAHU ANTIOXIDANTŮ
VE VYBRANÝCH POTRAVINOVÝCH DOPLŇCÍCH**

LUMINESCENCE DETERMINATION OF ANTIOXIDANTS TOTALLY CONTENT
IN SELECTED DIETARY SUPPLEMENTS

Bakalářská práce
studijního programu Chemie v přírodních vědách

Praha 2009

Karolína Průchová

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Mgr. Václava Červeného a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2.září 2009

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Václavu Červenému za odborné vedení, pomoc, rady a připomínky, které mi po celou dobu řešení mé bakalářské práce poskytoval.

Klíčová slova: (chemi)luminiscence, celková antioxidační aktivita, luminol
Předmětová hesla: potraviny, potravinové doplňky, Trolox

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	7
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Volné radikály.....	10
2.1.1 Vznik volných radikálů.....	10
2.1.2 Příčiny vzniku volných radikálů.....	12
2.1.3 Nepříznivé účinky volných radikálů.....	13
2.1.4 Příznivé účinky volných radikálů.....	14
2.2 Antioxidanty.....	14
2.2.1 Charakteristika antioxidantů.....	14
2.2.2 Rozdělení přirozených antioxidantů.....	15
2.2.3 Antioxidační účinky a vlivy dalších faktorů.....	16
2.2.4 Zástupci antioxidantů a jejich vlastnosti.....	17
2.2.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	21
2.2.5.1 Stanovení TAA	21
2.3 Luminiscence a chemiluminiscence.....	22
2.3.1 Princip luminiscence.....	23
2.3.2 Přednosti chemiluminiscenčních technik.....	25
2.4 Luminol (3-Aminophthalhydrazide).....	26
2.4.1 Chemiluminiscenční reakce luminolu.....	26
2.4.2 Použití luminolu.....	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1 Použité chemikálie.....	29
3.2 Použité vzorky s antioxidačními účinky.....	29
3.2.1 Z přírodních surovin.....	29
3.2.2 Syntetické doplňky stravy.....	30
3.3 Laboratorní přístroje.....	31
3.4 Pracovní postup.....	31
3.4.1 Pokusy s modelovými roztoky.....	31
3.4.1.1 Záznamy s použitím katalyzátoru.....	32
3.4.1.2 Záznamy bez použití katalyzátoru.....	34

3.4.2 Stanovení experimentálních podmínek pro měření kalibrace Troloxu.....	36
3.4.2.1 Koncentrace peroxidu vodíku.....	36
3.4.2.2 Objem peroxidu vodíku.....	37
3.4.2.3 Koncentrace Luminolu.....	37
3.4.2.4 Objem Troloxu.....	38
3.4.2.5 Napětí fotonásobiče.....	38
4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....	40
4.1 Měření kalibrační závislosti Troloxu.....	40
4.2 Mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost.....	41
4.3 Měření reálných vzorků.....	41
4.3.1 Měření TAA čajových extraktů	42
4.3.2 Měření TAA piva a vína.....	42
4.3.3 Měření TAA čerstvých šťáv z ovoce.....	43
4.3.4 Měření TAA čokolád.....	44
4.3.5 Měření TAA syntetických antioxidantů.....	44
5 DISKUZE A ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	46
6 ZÁVĚR.....	48
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	49

Seznam zkratek a symbolů

I	intenzita
c	koncentrace analytu
g	gram
λ	vlnová délka
t	čas
M	molární; $1 \text{ M} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
mM	milimolární; $1 \text{ mM} = 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
μM	mikromolární; $1 \mu\text{M} = 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
ml	mililitr; $1 \text{ ml} = 10^{-3} \text{ l}$
M_r	relativní molekulová hmotnost
nm	nanometry; $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$
SD	směrodatná odchylka
RNS	Reactive Nitrogen Species (reaktivní formy dusíku)
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktivní formy kyslíku)
SOD	superoxid dismutáza
TAA	Total Antioxidant Activity (celková antioxidační aktivita)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (antioxidační aktivita ekvivalentní množství Troloxu)
PCB	polychlorované bifenyly
GSH	glutathion
GSHPx	glutathionperoxidáza
LDL	Low Density Lipoprotein
EGCG	epigalokatechin-3-galát
NADH	nicotinamid adenin dinucleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)
DAF-FM	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein
BODIPY FL	druh fluoroforu; 1,3,5,7-tetramethyl-8-propionyl derivát 4,4-

	difluoro-4- bor-3a,4a-diaza-s-indacenu
CM-H2DCFDA	druh fluoroforu; 5-(and-6)-chloromethyl-2'7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
TEMPO-9-AC	4-((9-Acridinecarbonyl)amino)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin- 1-oxyl
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti

1 ÚVOD

Cílem bakalářské práce bylo stanovit množství antioxidantů ve vybraných potravinových doplncích, ovoci, nápojích a čokoládě. K tomuto účelu byla vyvinuta metoda využívající chemiluminiscenci luminolu. Nejprve byly zjišťovány optimální podmínky pro měření antioxidační aktivity v modelových roztocích, poté byla stanovována antioxidační aktivita jednotlivých vzorků. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako antioxidační aktivita ekvivalentního množství standardu Troloxu a vzájemně porovnány.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Volné radikály

V poslední době je věnována značná pozornost tématu volných radikálů v lidském organismu, zejména kvůli jejich možnému nepříznivému dopadu na lidské zdraví.^{1,2}

Volnými radikály jsou sloučeniny, jejichž atomy či molekuly obsahují alespoň jeden orbital s jedním nepárovým elektronem. Díky nepárovému elektronu jsou velmi nestabilní a reaktivní, vyhledávají chybějící elektron, aby vytvořily stabilní molekulu. Jedná se především o reaktivní kyslíkové radikály (ROS – Reactive Oxygen Species) a dusíkové radikály (RNS – Reactive Nitrogen Species), mající značný fyziologický i patogenický význam.³

Kyslík je jedním ze základních prvků nezbytných pro udržení života, ale může mít i škodlivé účinky, pokud množství jeho reaktivních sloučenin ve formě volných radikálů přesáhne potřebu buněk a není zablokováno. Nadprodukce reaktivních sloučenin kyslíku se označuje jako oxidační stres.^{1,4}

2.1.1. Vznik volných radikálů

Volný radikál vzniká z molekul třemi způsoby :

- **homolytickým štěpením** kovalentní chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron
- **přidáním jednoho elektronu** k neutrální molekule (redukce)
- **ztrátou jednoho elektronu** (oxidací)

Mezi reaktivní formy kyslíku se řadí například superoxid ($O_2^{\bullet-}$) vznikající přijetím jednoho elektronu molekulou kyslíku : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$. Pokud superoxid přijme další elektron, dojde k redukci na peroxid vodíku : $O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$. Vzniklý peroxid vodíku se může vlivem dalšího elektronu rozpadnout na vodu a hydroxylový radikál (HO^{\bullet}) a ten opět reaguje s jedním elektronem za vzniku hydroxidového anionu (OH^-). Tato čtyřelektronová redukce molekulového kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života a probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy. Vzniklý hydroxylový radikál není ve vazbě s enzymem škodlivý. Za jiné situace, v tzv. Fentonově reakci, vzniká z peroxidu vodíku v reakci s dvojmocným železem vysoce toxický hydroxylový radikál HO^{\bullet} , který v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními

molekulami, a jako extrémně silné oxidační činidlo vytrhuje elektron z nenasycených mastných kyselin a atakuje baze nukleových kyselin.³

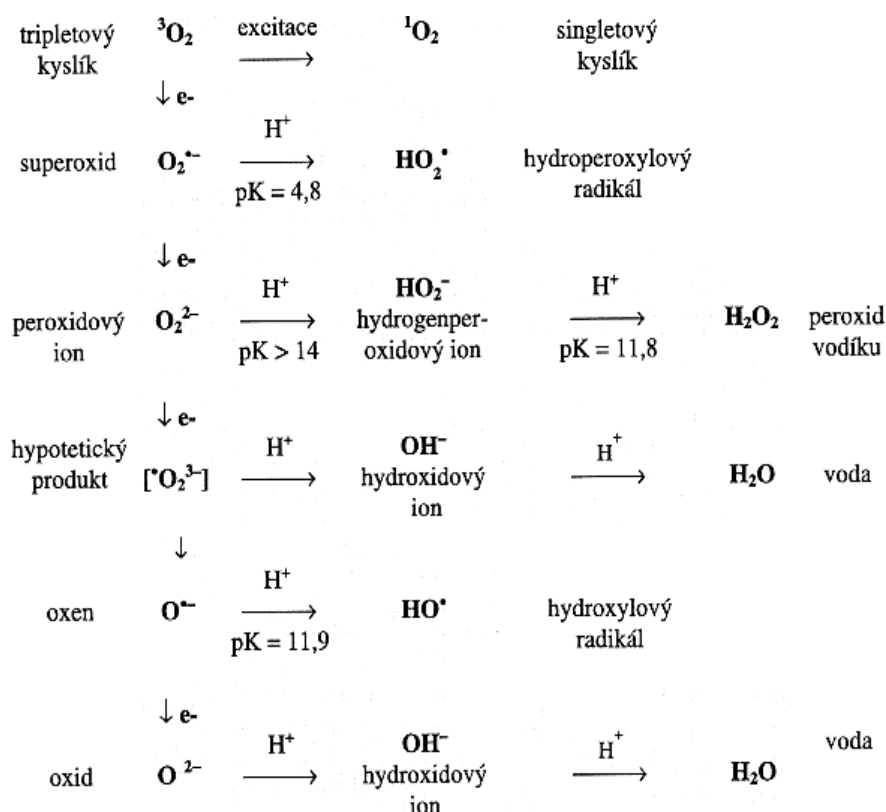
Fentonova reakce: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$

Tab.2.1.a a Tab.2.1.b: *Reaktivní formy kyslíku*³

Volné radikály		Látky, které nejsou volnými radikály	
název	vzorec	název	vzorec
superoxid	O_2^\bullet	peroxid vodíku	H_2O_2
hydroxylový radikál	HO^\bullet	kyselina chlorná	HOCl
peroxyl	ROO^\bullet	ozon	O_3
alkoxyl	RO^\bullet	singletový kyslík	$^1\text{O}_2$
hydroperoxyl	HO_2^\bullet		

Tab.2.2.a a Tab 2.2.b: *Reaktivní formy dusíku*³

Volné radikály		Látky, které nejsou volnými radikály	
název	vzorec	název	vzorec
oxid dusnatý	NO^\bullet	nitrosyl	NO^+
oxid dusičitý	NO_2^\bullet	nitroxid	NO
		kyselina dusitá	HNO_2
		oxid dusitý	N_2O_3
		oxid dusičitý	N_2O_4
		nitronium	NO_2^+
		peroxynitrit	ONOO
		alkylperoxynitrit	ROONO



Obr. 2.1: Postupná redukce kyslíku ⁵

2.1.2 Příčiny vzniku volných radikálů

Podle toho, zda se volné radikály do organismu dostávají zvenčí či vznikají v průběhu metabolismu, rozdělujeme příčiny vzniku volných radikálů na exogenní a endogenní.¹

Exogenní příčiny:

- Ionizující záření
- UV-záření
- Vysoký obsah škodlivin ve vzduchu
- Kouření
- Intoxikace (PCB, tetrachlormethan, chloroform, alkohol, ..)
- Potrava

Endogenní příčiny

- Vznik kyseliny močové – při úrazech, nekrotázách, pooperačních stavech
- Rozpad fagocytů a makrofágů
- Vznik methemoglobinu
- Syntéza prostaglandinů
- Zvýšený metabolismus estrogenů
- Autooxidace thiolů
- Hyperglykémie

2.1.3 Nepříznivé účinky volných radikálů

Volné radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Reakce iniciované radikály vedou k následným změnám ve struktuře buněk, poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Různé formy reaktivního kyslíku (singletový kyslík, superoxid, hydroxy radikály a peroxidy) jsou fyziologicky produkovány v procesech jako je Alzheimerova choroba, apoptóza nebo fagocytóza a oxidují různé buněčné složky, jako NADH, NADPH, histidin, kyselinu askorbovou, tryptofan, tyrozin, cystein, glutathion, proteiny a nukleové kyseliny, a rovněž cholesterol a nenasycené mastné kyseliny.^{1,6}

Některé volné radikály jsou běžnou součástí zdravého metabolismu, jiné se objevují nebo se jejich množství v těle zvyšuje v průběhu nemoci, psychické a fyzické zátěže, může se zvyšovat při nedostatečné či nadměrné výživě a při pobytu ve znečištěném prostředí. Volné radikály jsou také příčinou rychlého opotřebovávání tkáňových buněk. Proto je nutné volným radikálům, které vznikají in vivo a ovlivňují celou řadu fyziologických funkcí, věnovat stále velkou pozornost.⁶

2.1.4 Příznivé účinky volných radikálů

Volné radikály se v lidském organismu nemusí projevovat pouze škodlivě, mohou mít i řadu pozitivních funkcí v imunitním systému. Jsou vytvářeny při metabolických pochodech a podílejí se na biosyntéze pro organismus nezbytných látek, jako jsou bílkoviny, hormony či nukleové kyseliny, uplatňují se například při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin. Podílejí se na zneškodnění patogenů nebo se uplatňují při detoxikaci některých xenobiotik a mnohých léků. Peroxid vodíku je nezbytný pro oxidaci jodidu na elementární jód, který je využit štítnou žlázou k jodaci aromatických jader tyroxinu.⁶ Některé z radikálů mohou buňky poškozovat. Buňky však mají na obranu proti nim ochranné enzymatické mechanismy, které je neutralizují. Jejich součástí jsou například vitaminy E a C, tripeptid glutathion nebo enzym superoxiddismutáza.¹

Během 70 let života se v těle vytvoří asi 17 tun volných radikálů.⁷

2.2 Antioxidanty

2.2.1 Charakteristika antioxidantů

Antioxidanty jsou látky, jejichž molekuly mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek tím, že omezují aktivitu kyslíkových radikálů, snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů, čímž chrání naše tělo proti nežádoucím oxidačním procesům.⁸

Antioxidanty je možno rozdělit do několika skupin.⁹ Na **přirozené** (v přírodě nebo dané potravině se přirozeně vyskytující, byť normálně třeba v menších koncentracích) a **syntetické** (ve smyslu uměle vytvořené a bez patřičného relevantního výskytu v přírodě) a přirozené dále na ty, které si **vytváří naše tělo samo** a na ty, které musíme **získat z potravy**. Minerály samy o sobě nejsou antioxidanty, některé z nich se ale mohou stát vitálními složkami antioxidačních enzymů vytvářených tělem (selen, železo, mangan, měď, zinek). Dále lze antioxidanty rozdělit na **rozpustné v tucích** (lipofilní) či **ve vodě** (hydrofilní).

2.2.2 Rozdělení přirozených antioxidantů¹⁰

Hydrofilní

Intracelulární

- **Enzymové** (□ superoxiddismutáza (SOD), glutathionperoxidáza (GSHPx), peroxidázy, kataláza)¹¹

- **Neenzymové** - □ (glutathion (GSH))

Extracelulární

- **Vysokomolekulární** (albumin a jiné bílkoviny obsahující -SH skupiny, transferin, ceruloplazmin, haptoglobin, hemopexin)

- **Nízkomolekulární** (kyselina askorbová, kyselina močová, bilirubin, polyfenolické sloučeniny)

Lipofilní¹¹

- Vitamin E (α - tokoferol)
- Karotenoidy (β -karoten, lykopen)
- Ubichinol (koenzym Q10)
- Estrogeny a některé další steroidy
- β -karoten

Amfofilní

- obsahují hydro- i lipofilní část
- Kyselina lipoová
- Melatonin
- Fenolické sloučeniny (flavonoidy, fenolické kyseliny)

Podle stupně oxidace C3 řetězce se rozeznávají následující základní struktury flavonoidů:

- Katechiny (3-flavanoly)
- Leukoanthokyanidiny (3,4-flavandioly)
- Flavanony
- Flavony
- Flavonoly
- Anthokyanidiny

2.2.3 Antioxidační účinky a vlivy dalších faktorů

Antioxidační účinek látek je dán jejich specifickou strukturou. U látek fenolového typu (tokoferoly, flavonoidy, fenolové kyseliny), které jsou schopné přerušit řetězovou radikálovou reakci, je jejich antioxidační schopnost závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin i typu dalších substituentů (alkyl, alkoxykupina, allylové uskupení, glykosidická část). Těmito strukturními faktory je podmíněna snadnost odštěpení vodíku z molekuly antioxidantu, čímž se inaktivují radikály vzniklé oxidací lipidů nebo metabolickými pochody, např. hydroxylový radikál. Dále je jimi ovlivněna míra stabilizace vzniklého radikálu antioxidantu, snadnost reakce s jiným radikálem či schopnost chelatovat kovy katalyzující oxidaci. Funkčními skupinami v molekule antioxidantu je určena též polarita a hydrofobně-lipofilní vlastnosti molekuly.

Kromě struktury je antioxidační aktivita antioxidantů ovlivněna i pH systémem a stabilitou sloučenin během zpracování suroviny (teplotou, fermentací). Důležitá je též přítomnost dalších látek v systému, které mohou působit jako synergisté (například celkový efekt všech přítomných antioxidantů je větší než součet účinků jednotlivých antioxidantů) nebo jako antagonisté.¹²

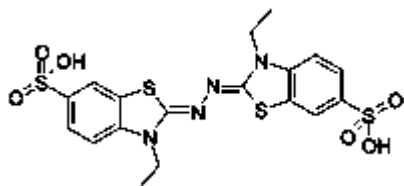
Antioxidanty snižují riziko propuknutí mnoha nemocí způsobených volnými radikály – snižují riziko vzniku karcinogenních a mutagenních procesů, srdečně-cévních chorob (například snižují hladinu LDL cholesterolu v krvi a tedy i riziko aterosklerózy a trombózy, potlačují tendence spojování malých krevních buněk a tím i tvorbu sraženin – tzv. „aspirinový účinek“, zmírňují zánětlivé cévní procesy), zánětlivých procesů při artritidě (způsobené superoxidovým anionem) či šedého zákalu. Zpomalují i procesy stárnutí. Je popsán též vliv na obnovu jaterních buněk, hypoazotemický účinek a řada dalších účinků.¹³ Je jimi regulována aktivita enzymů (např. inhibice oxygenasy, lipxygenasy), mají antivirální, antibakteriální a antifungální účinky.

2.2.4 Zástupci antioxidantů a jejich vlastnosti^{10, 11}

Vitamín E¹⁴

Pod názvem vitamín E je zahrnuta skupina osmi izomerů tokoferolu, z nichž biologicky nejúčinnější je α -tokoferol. Díky vedlejšímu izoprenovému řetězci je vitamín E nerozpustný ve vodě a vykazuje lipofilní charakter. Vitamín E je typický membránový antioxidant, uplatňuje se v antioxidační ochraně lipidů biologických membrán a lipoproteinových částic plazmy. Významnou měrou se podílí na prevenci mnoha cévních onemocnění, snižuje riziko vzniku infarktu myokardu. Některé studie tvrdí, že dlouhodobé užívání přírodního vitamínu E denně může snížit riziko infarktu myokardu o více než 70%. Jeho bohatým zdrojem jsou rostlinné oleje, především oleje z obilných klíčků.

Při reakci vitamínu E s volnými radikály však vzniká tokoferylový radikál, tím se vitamín E inaktivuje a ztrácí svou antioxidační aktivitu. Regeneraci vitamínu E zajišťuje vitamín C, který je následně regenerován glutathionem.

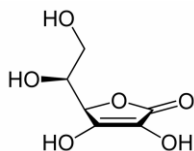


Obr.2.2: Chemická struktura vitamínu E

Vitamín C

Kyselina askorbová působí jako kofaktor řady enzymů, je potřebná pro hydroxylaci aminokyselin prolinu a lyzinu při biosyntéze kolagenu, uplatňuje se při tvorbě glukosaminoglykanů, karnitinu, noradrenalinu a účastní se metabolismu cholesterolu. Významnou roli sehrává při oxidoredukčních dějích.

Antioxidační účinek askorbátu spočívá v redukci anorganických i organických radikálů jako $O_2^{\bullet-}$, $HO_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet-}$, $NO_2^{\bullet-}$, $RO_2^{\bullet-}$, reaguje s 1O_2 a $HClO$. Vitamín C stimuluje obranyschopnost organismu, zvyšuje aktivitu fagocytů a chrání jejich membrány před oxidačním poškozením.



Obr.2.3: Chemická struktura vitamínu C

Selen

Má přímý antioxidační účinek, protože je součástí glutathionperoxidázy. Je obsažen v červených krvinkách, v játrech, je součástí řady enzymů v buňkách, které mají protiradikálové působení, tudíž chrání organismus před radikálovým poškozením, k němuž může docházet při stresu.

Zinek

Aktivuje řadu enzymů, jako např. antioxidační enzym superoxiddismutázu, který chrání buňky proti škodlivému působení volných radikálů vyvolaných stresem. Je také důležitý pro posílení imunitních reakcí probíhajících v těle.

Polyfenolické antioxidanty ¹⁵

Polyfenolické látky se člení na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany.

Fenolové kyseliny se dělí do dvou tříd. Na **kyseliny skořicové**, kam patří kyselina kávová (obsažená v olivách, kávě, bílém vínu, špenátu) či ferulová (obsažená v pšenici, rýži, rajčatech) a **kyseliny benzoové**, kam patří hlavně kyseliny galová a ellagová, vyskytující se převážně v bobulích (malinách, jahodách, ostružinách). Významným zdrojem kyseliny galové je čaj.

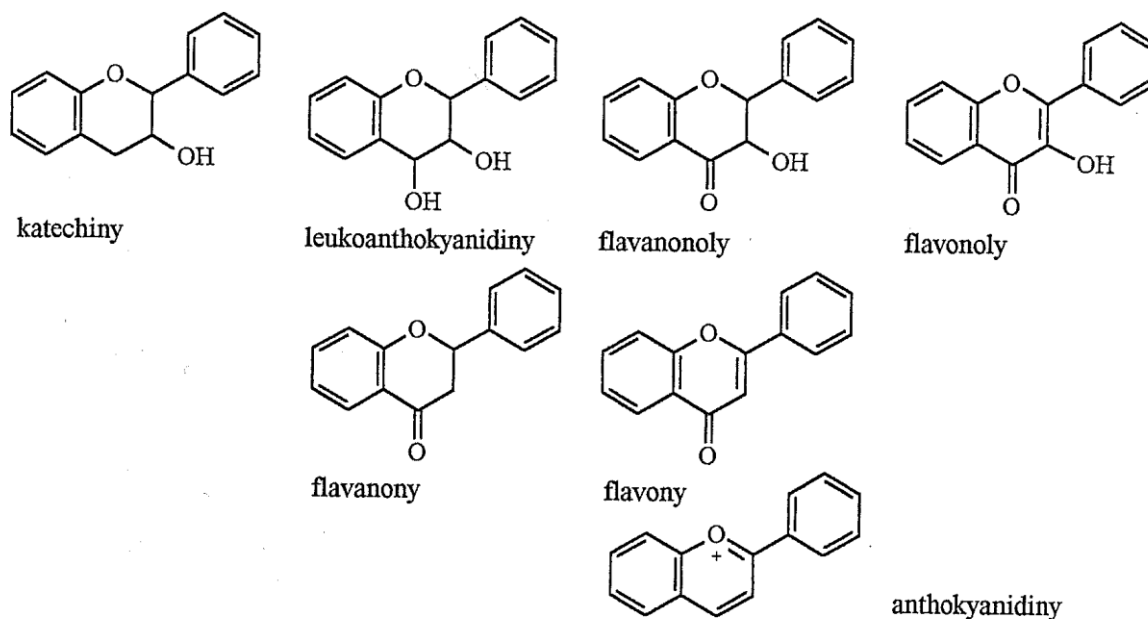
Stilbeny jsou strukturně podobné flavonoidům, jsou v lidské výživě zastoupeny pouze v malém množství. Vyskytují se ve volné formě nebo vázané jako glykosidy. Patří mezi ně především **resveratrol**, v hojné míře zastoupený v červeném víně.

Lignany bývají pro svoji estrogenní aktivitu také řazeny do skupiny fytoestrogenů. Lignany se nacházejí především v různých druzích semen, v celých zrnech, luscích zeleniny a v ovoci. Při technologickém zpracování však dochází k odstranění lignanů se slupkami společně s vlákninou a proto je lidská strava na tyto látky celkem chudá. Nejbohatším zdrojem lignanů je lněné semínko, lněný olej a celozrnné žitné pečivo.

Flavonoidy jsou velmi rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. V současné době je známo více než 4 000 flavonoidních látek. Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými jádry, spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Mezi hlavní skupiny flavonoidů ve výživě člověka patří **flavonoly, flavony, flavanoly (katechiny a proantokyanidiny), anthokyanidiny, flavanony a isoflavonoidy**.¹⁵ Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů.

Flavonoidy jsou důležitou součástí antioxidačního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty jako je železo či měď. Přírodní flavonoidy s popsány vlastnostmi mohou účinně působit v prevenci chorob majících původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění).

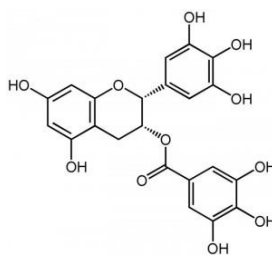
Významnými flavonoidy ve výživě člověka jsou **flavonoly kvercetin a kemferol**, které se nachází ve vysokých koncentracích v běžně konzumovaných potravinách jako je cibule, jablka, kapusta, olivový olej, červené víno, čaj. Řadí se sem i rutin ovlivňující pružnost a propustnost krevních kapilár, jehož bohatým zdrojem je pohanka.¹³ Mezi **flavony** patří například apigenin (v celeru a petrželi). Hlavními **flavanoly** jsou **katechiny** (zejména katechin, epikatechin, epigalokatechin, epigalokatechin-3-galát). Jsou přítomné hlavně v bílém a zeleném čaji. V černém čaji je jejich obsah během fermentace redukován. Další zdroje jsou červené víno a čokoláda. **Proantokyanidiny** jsou polymerní flavanoly. Vykazují astringentní (stahující, svíravé) účinky, běžným zdrojem jsou jablka, hrušky, hrozny, červené víno, čaj, čokoláda a kakao. **Antokyanidiny** jsou červená barviva např. v třešních, švestkách, rybízu a malinách. **Flavanony** nazývané rovněž „citrusové“ flavonoidy, jsou látky typicky se vyskytující v pomerančích a grapefruitech. K hlavním zástupcům se řadí **naringenin, hesperetin** a jejich glykosidy. Zvláštní skupinu flavonoidů tvoří **isoflavonoidy**, k nimž patří především isoflavony daidzein a genistein.¹⁶ Nachází se hlavně v luštěninách, vydatným zdrojem je sója a veškeré produkty z ní. Jejich průměrný příjem ve stravě je v Japonsku vzhledem k její vysoké konzumaci poměrně vyšší než u evropské populace. Bohatým zdrojem flavonoidů jsou některá semena (hojně v celozrnném pečivu), zejména jejich aleuronová vrstva, která však bývá při výrobě mouky, loupané rýže a jiných potravin odstraněna. Nemalé zastoupení mají flavonoidy i v extraktech různých bylin a koření.



Obr 2.4: *Struktura flavonoidů*¹⁵

Flavonoidy obecně působí jako prevence proti vzniku řady nemocí, zejména proti rakovině a cévním chorobám, zánětlivým onemocněním, ale i řadě dalších. V poslední době vstupuje více do popředí zájem o katechiny, flavonoly, prokyanidiny, anthokyanidiny obsažené především v čaji (bílém, zeleném, černém) a kakaových bobech, dále i ve víně (hlavně červeném) a pivu.¹⁷ Jsou spojovány s účinnou prevencí proti výše zmíněným chorobám.^{18,19,20,21,22} V bílém, zeleném a menší míře i černém čaji je to zejména epigalokatechin-3-galát, dále katechiny, kvercetin, prokyanidiny a další zástupci, v kakaových bobech zejména katechiny (katechin, epikatechin) prokyanidiny a anthokyanidiny, v pivu kvercetin, epigalokatechin a 25 dalších druhů antioxidantů, v červeném víně anthokyanidy, katechiny a stilben resveratrol.

Za nejvýznamnější látku ze skupiny katechinů je považován právě **epigalokatechin-3-galát (EGCG)**.²³ Vyskytuje se zejména v bílém a zeleném čaji. Bílý čaj se vyrábí z pupenů a prvních listů kamélie čínské, ze starších lístků se vyrábí čaj zelený, který je nefermentovaný, či černý, jenž prošel fermentací. Bílý čaj je také bohatší než zelený a černý na účinnou látku epigalokatechin-3-galát.



Obr.2.5: *Epigallocatechin-3-galát:*

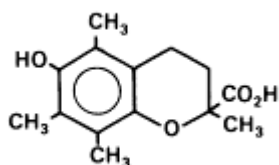
Živočichové flavonoidy netvoří, mohou jich však nezanedbatelné množství přijímat v rostlinné stravě. Fermentací střevními bakteriemi jsou flavonoidy uvolněny z vyšších struktur, jejichž součástí jsou v rostlinném organismu, a spolu s ostatními složkami potravy vstřebány. V organismu jsou působením příslušných enzymů převedeny na mnohem rozpustnější sulfáty nebo glukuronidy, výjimkou není ani vznik kombinovaných konjugátů s oběma „hydrofylizujícími“ molekulami. Převážně ve formě konjugátů jsou pak vyloučeny močí, zhruba jedna desetina je vyloučena jako čisté (nekonjugované) flavonoidy. Vrcholu koncentrace v krvi dosahují flavonoidy zhruba 4 hodiny po konzumaci rostlinné potravy, po 24 hodinách koncentrace klesá k nule.

2.2.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity ²⁴

Ke sledování antioxidačního potenciálu rostlinného materiálu nebo samotného antioxidantu lze využít testy zkoumající schopnost látky zachycovat volné radikály. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem **celková antioxidační aktivita TAA** (Total Antioxidant Activity). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Existuje velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. TAA se nejčastěji stanovuje metodou TEAC, využívající syntetický antioxidant Trolox jako standard.

2.2.5.1 Stanovení TAA

Při spektrofotometrickém stanovení TAA je možno antioxidační aktivitu stanovit ze změny absorptivity po přidání antioxidantu k roztoku s vhodnými činidly.²⁴ Při spektrofluorimetrickém stanovení je s využitím vhodné detekční metody možno TAA určit z poklesu luminiscence roztoku po přidání antioxidantu. Antioxidační aktivita je pak srovnávána s antioxidační aktivitou syntetické látky, standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina).



Obr.2.6: Chemická struktura Troloxu

Použití syntetického antioxidantu Troloxu (ve vodě rozpustný homolog vitamínu E) jako standardní látky našlo inspiraci v metodě TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) - metodě používající Trolox jako srovnávací standard pro určení antioxidační kapacity sledované látky. Metoda TEAC je často uváděna ve spojitosti s použitím syntetických kation-radikálů ABTS^{•+} pro stanovení TAA.²⁴

2.3 Luminiscence a chemiluminiscence²⁵

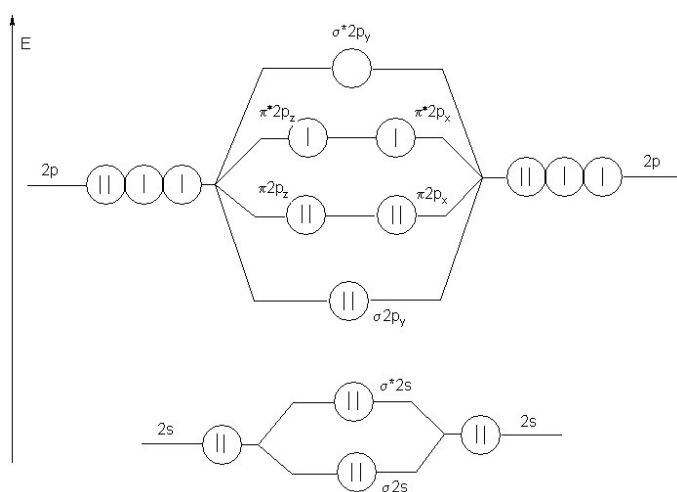
Při absorpci záření v UV nebo VIS oblasti molekulou látky dochází k přeskoku elektronu na energeticky vyšší nestabilní hladinu. Následně je část přijaté energie uvolněna nezářivými přechody (kolizními deaktivacemi) a zbylá část je vyzářena ve formě luminiscenčního záření, které lze popsat jako světélkování. Podle povahy původně absorbované energie lze luminiscenční záření molekul dělit do několika kategorií. Při chemiluminiscenci je energie látky dodána chemickou reakcí. Různé typy luminiscence jsou uvedeny v tabulce 2.3.

Tab. 2.3 Typy luminiscence²⁵

Typ luminiscence	Způsob excitace
Fotoluminiscence	foton
Chemiluminiscence	chemická reakce
Bioluminiscence	biochemický proces
Elektroluminiscence	injekce elektronu nebo díry
Termoluminiscence	tepelná energie
Katodoluminiscence	katodové paprsky (e ⁻)
Sonoluminiscence	ultrazvuk
Radioluminiscence	γ-záření
Triboluminiscence	tření

2.3.1 Princip luminiscence²⁶

V základním stavu má látka dva elektrony v HOMO (z anglického The Highest Occupied Molecular Orbital - nejvyšší obsazený molekulový orbital) orbitalu, dodáním energie jeden z nich přejde do tzv. LUMO orbitalu (nejnižší neobsazený molekulový orbital – z anglického The Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Takto vzniklý stav je velmi nestabilní a zároveň bohatý na energii. Dochází proto k návratu elektronu z orbitalu LUMO do orbitalu HOMO a zároveň k vyzáření kvanta energie ve formě luminiscence. Jako jednoduchý příklad lze uvést molekulu kyslíku. Multiplicita „normální“ molekuly kyslíku je tripletová. Pokud by se však tyto dva elektrony spárovaly („přeskočily“ oba do orbitalu σ^*2p), získáme kyslík singletový (excitovaný stav oproti kyslíku ve vzduchu). Energie vazby v těchto molekulách je nižší oproti vazbě v normální tripletové molekule a proto je singletový kyslík mnohem reaktivnější. Sám proto opět přechází do základního stavu, přičemž svou nadbytečnou energii vyzáří v podobě viditelného světla.



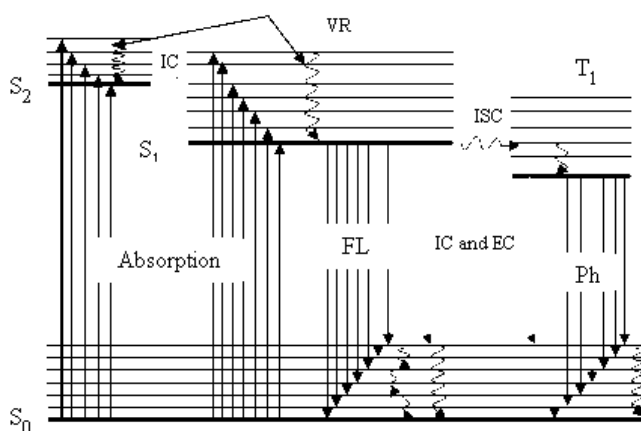
Obr.2.7: Diagram znázorňující energetické hladiny molekulových orbitalů a jejich obsazení jednotlivými elektrony v molekule kyslíku O₂ v základním, tzv. tripletovém stavu²⁶

Při absorpci vhodné energie molekulou s párovými elektrony (zpravidla orbitalu π) mohou nastat následující situace:²⁵

- přechod jednoho z párových elektronů do prvního excitovaného singletového stavu S₁, ve kterém se jeho výsledný spinový moment nezměnil; molekula má zpravidla velmi

krátkou dobu života, přijatou energii předává jiným částicím srážkami (*nezářivým přechodem při kolizní deaktivaci*)

- přechod do stavu S_1 , který je tentokrát poměrně stabilní, následně elektron přechází zpět do základního elektronového singletového stavu S_0 složitějším mechanismem. Excitovaná molekula přejde nezářivým přechodem (*vibrační relaxací*) na nejnižší základní vibrační hladinu stavu S_1 , poté dochází k **fluorescenci**, elektrony se vracejí do různých vibračních podhladin stavu S_0 .
- po přechodu do stavu S_1 přejde elektron tzv. *interkombinační konverzí* (nezářivý přechod) z nejnižšího vibračního stavu S_1 na vyšší vibrační hladinu excitovaného tripletového stavu T_1 (má menší energii), kdy v systému existují 2 elektrony se stejným spinem. Molekula má nadbytek vibrační energie a přejde nejprve deaktivacím nezářivým přechodem do základního vibračního stavu T_1 . Tento stav má dlouhou dobu života, neboť přechod do S_0 je spinově zakázaný, elektron přechází zpět do základního stavu S_0 **fosforescencí**.



Obr.2.8: Zářivé a nezářivé přechody – Jablonského diagram

Nezářivé přechody:

VR - vibrační relaxace

IC - vnitřní konverze

ISC - mezisystémová konverze

Zářivé (luminiscenční) přechody:

Fluorescence (FL) - přechod do nižšího elektronového stavu

se stejnou multiplicitou $S1 \rightarrow S0$

spinově povolený přechod

Fosforescence (Ph) - přechod mezi stavy s různou

multiplicitou $T1 \rightarrow S0$

spinově zakázaný přechod

Skupiny v molekule, na kterých dochází k absorpci a emisi elektromagnetického záření se nazývají chromofory či fluorofory. Mezi sloučeniny obsahující fluorofory můžeme zařadit tyto látky:

- sloučeniny s jednou nebo více skupinami s volným elektronovým párem (- OH, -NH₂, -OCH₃)
- sloučeniny obsahující heteroatom
- polycyklické sloučeniny (vitamin K, ...)
- konjugované dvojné vazby, benzenová jádra (Vitamin A)

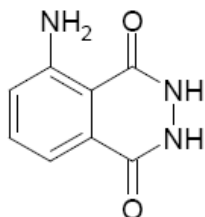
Intenzita luminiscence může být ovlivněna tzv. zhášeči. Jako intermolekulární zhášení luminiscence lze uvést neelastické srážky mezi excitovanými a neexcitovanými částicemi. Fluorescenci ale mohou zhášet i různé organické látky, anorganické kationty a anionty, molekulární kyslík a dusík.

2.3.2 Přednosti chemiluminiscenčních technik ^{25,31}

Mezi hlavní přednosti luminiscenčních technik patří:

- ***vysoká citlivost*** (s pomocí chemiluminiscence lze stanovit až 600 molekul dané látky)
- ***selektivita*** (světlo, které zachytí přístroj, vzniká pouze při reakci s hledanou látkou)
- ***rychlost a množství stanovení***
- ***možnost sledování emisí a imisí v životním prostředí*** (chemiluminiscence plynů)
- ***možnost stanovení biologicky důležitých látek*** v biochemii, farmacii, biologii, ekologii

2.4 Luminol (3-Aminoftalhydrazid) ²⁷



Obr.2.9: *Struktura luminolu*

Luminol je odrazovým můstkem v oblasti výzkumu chemiluminiscence – byl objeven roku 1928 a od té doby se datují další objevy v této oblasti. Je to všestranná chemikálie, která po smíchání s vhodným okysličovadlem poskytuje chemiluminiscenci s modrým světlem. Je to bílá až lehce nažloutlá krystalická látka, která je rozpustná ve většině polárních organických rozpouštědel, ale nerozpustná ve vodě.

2.4.1 Chemiluminiscenční reakce luminolu ²⁶

Metoda využívající pro stanovení TAA chemiluminiscenci luminolu patří mezi metody založené na eliminaci syntetických radikálů. K vyvolání chemiluminiscence musí být luminol nejprve aktivován oxidačním činidlem v bazickém prostředí - obvykle roztokem peroxidu vodíku a hydroxidu sodného ve vodě a v přítomnosti katalyzátoru (těžkého kovu - např. ionty Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+}).

V reakční směsi luminolu s hydroxidem sodným jsou po oxidaci luminolu peroxidem vodíku generovány peroxylové radikály kyseliny 3-aminofthalové (obr.2.10). Současně je uvolňováno luminiscenční záření, které je proměřováno spektrofluorimetrem a zaznamenáváno jako emisní spektrum. Po přidání látky s antioxidačním účinkem jsou radikály eliminovány a současně s jejich eliminací zhášeno i luminiscenční záření. Ve spektru to lze pozorovat zpravidla prudkým poklesem intenzity sledovaného záření. Úbytek luminiscence je úměrný antioxidační aktivitě sledované látky ve vzorku.



Luminol se používá k detekci různých druhů reaktivního kyslíku. Jeho využití v biomedicíně ukazuje tabulka.²⁹

Tab 2.4: *Druhy reaktivního kyslíku detegované luminolem*

druh reaktivního kyslíku	struktura	příklady detekčních látek
Peroxid vodíku	H_2O_2	Dihydroxycalcein AM, Dihydrorhodamin 6G, Luminol , Lucigenin
Kyselina chlorná	$HOCl$	Dihydrorhodamin 123, Luminol
Oxid dusnatý	NO	DAF-FM, DAA, Luminol
Peroxylový radikál	$ROO\cdot$	BODIPY FL EDA, Luminol , <i>cis</i> -Parinaric acid
Peroxynitritový anion	$ONOO^-$	H_2DCFDA , Coelenterazine, Dihydrorhodamin 123, Luminol
Superoxidový anion	$\cdot O_2^-$	Coelenterazine, Dihydroethidium, Lucigenin, Luminol , TEMPO-9-AC

Luminol je používán v kriminalistice k orientačním důkazům krve (krvavých skvrn).³⁰ Vyšetřovatel připraví roztok luminolu v bazickém prostředí a aktivátor (peroxid vodíku) a postříká jimi vyšetřovanou oblast. Železo přítomné v krvi katalyzuje chemickou reakci, která vede k luminiscenci a odhalení krvavé stopy. Luminiscence trvá asi 30 sekund a vydává modré světlo.

V laboratořích klinické biochemie a imunochemie. Používá se jako chemiluminiscenční marker ke stanovení nepatrných koncentrací hormonů, bílkovin, léčiv, protilátek, receptorů a dalších látek v tělních tekutinách.

Na luminol-boraxovém systému je založen důkaz fosfoorganických chemických bojových látek, speciálně nejvíce toxických nervových plynů somanu (pinakolyester kyseliny methylfluorofosforečné), sarinu (isopropylester kyseliny methylfluorofosforečné) a tabunu (ethylester kyseliny dimethylaminokyanofosforečné). Touto metodou mohou být okamžitě detegovány výše uvedené bojové látky v množství do 0,5 mikrogramu na metr krychlový.³¹

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- **Luminol (3-Aminoftalhydrazid)**; $M_r = 177,16$; čistota 98%;
Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo
- **NaOH p.a**; $M_r = 39,99$, Lachema s.p.Brno, Česká republika;
- **H₂O₂ 30% p.a**; $M_r = 34,02$; Lach – Ner s.r.o., Česká republika
- **CuSO₄ . 5H₂O**; $M_r = 249,69$; připraven 0,1M roztok (2,5g rozpuštěno ve 100ml deionizované vody)
- **Methanol p.a.**, $M_r = 32,04$, Lachema, Neratovice, Česká republika
- **Trolox** (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina);
 $M_r = 250,3$; Merck, Darmstadt, Německo; zásobní 1 mM roztok v methanolu (25 mg Troloxu rozpuštěno a doplněno na celkový objem 100 ml methanolem)
- **Deionizovaná voda** produkovaná zařízením Mili QPLUS; Milipore; USA

3.2 Použité vzorky s antioxidačními účinky

3.2.1 Z přírodních surovin

- **Tmavá čokoláda CARLA- CZECH CHOCO, kakaová sušina 70%**
Carla spol. s r.o., Dvůr Králové nad Labem, Česká republika
- **Mléčná čokoláda CARLA- CZECH CHOCO, kakaová sušina 30%**
Carla spol. s r.o., Dvůr Králové nad Labem, Česká republika

- **Bílý čaj *WHITE TEA*; Teekanne**; vyrobeno v EU

1 čajový sáček o hmotnosti 1,446 g zalit 250 ml vroucí vody, doba louhování 3 min (podle návodu)

- **Zelený čaj *ZEN CHAI*; Teekanne**; vyrobeno v EU

1 čajový sáček o hmotnosti 1,974 g zalit 250 ml vroucí vody, doba louhování 5 min (podle návodu)

- **Černý čaj *YELLOW LABEL*; Lipton**; Unilever Warszawa, Polsko

1 čajový sáček o hmotnosti 2,214 g zalit 250 ml vroucí vody, doba louhování 2 min (podle návodu)

- **Zelený čaj *SAYONARA*; Phoenix**; Plzeň, Česká republika

1,977 g čajového prášku (1 zarovnaná čajová lžička) zalito 330 ml vody o teplotě asi 90°C; doba louhování 7 min (podle návodu)

- **Červené víno *FRANKOVKA***; Vyrobeno v EU

- **Pivo *GAMBRINUS 10°*, *světlý ležák***; Gambrinus Plzeň, Česká republika

- **Čerstvě vymačkaná citrónová šťáva**

- **Čerstvě vymačkaná šťáva z kiwi**

3.2.2 Syntetické doplňky stravy

- ***ANTIOXIDANT* ; Walmark**, Česká republika; 30 tablet

Složení 1 tablety: *vitamín A 750µg, vitamín C 50mg, vitamín E 16,8 mg, selen 25 µg*

- ***GS VITAMIN E, SELEN, ZINEK* ; Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s.**,
Česká republika, 60 kapslí

Složení 1 tablety: *vitamín E 100 mg, selen 50 µg, zinek 15 mg*

3.3 Laboratorní přístroje

Spektrofluorimetr AMINCO – Bowman Series 2 (AB2); Thermospectronic, USA

připojený k řídicímu počítači, spektrum snímáno v intervalu vlnových délek 200 – 700 nm, šířka spektrálního intervalu 1 nm.

Křemenná kyveta s tloušťkou absorbující vrstvy 10 mm; STARNA; Essex, England

Magnetické míchadlo

3.4 Pracovní postup a optimalizace

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity ve vybraných potravinových doplncích, ovoci, nápojích a čokoládě bylo nejprve nutné vyvinout vhodnou metodu využívající chemiluminiscenci luminolu pro stanovení TAA.

Byl hledán takový postup provedení chemiluminiscenčního experimentu, který by byl aplikovatelný pro stanovení TAA našich vzorků. Informací o luminiscenčních pokusech bylo k dispozici poměrně velké množství. Pozornost byla zaměřena na nejlépe proveditelné chemiluminiscenční experimenty s luminolem, z nichž byla čerpána inspirace pro vyvinutí vlastní metody.²⁶ Pokusy byly zpočátku prováděny s katalyzátorem, roztokem CuSO_4 , neboť tento katalyzátor se účastnil mnoha reakcí u sledovaných experimentů. Byla provedena řada měření dokazujících, že použití katalyzátoru není vhodné pro stanovení TAA (kapitola 3.4.1).

Po provedení úspěšných chemiluminiscenčních pokusů s modelovými roztoky bez katalyzátoru bylo zřejmé, že hledaný postup stanovení TAA pomocí Luminolu byl objeven. Jako nejlepší se prokázala být poměrně jednoduchá metoda využívající k luminiscenci Luminolu pouze bazické prostředí hydroxidu sodného a oxidační činidlo peroxid vodíku. Tato metoda proto byla použita pro stanovení TAA.

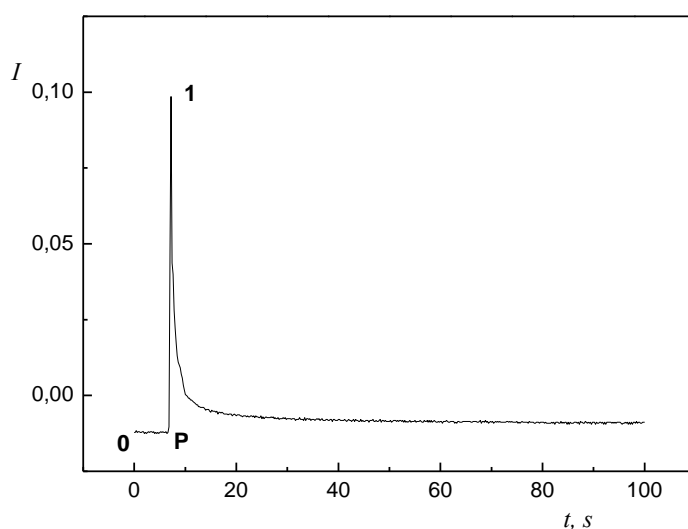
3.4.1 Pokusy s modelovými roztoky

Provedení pokusů s různě koncentrovanými roztoky zásobních roztoků Luminolu v NaOH, peroxidu, katalyzátoru CuSO_4 se ukázalo být přínosné nejen díky objevení vhodné luminiscenční metody pro stanovení TAA, ale též kvůli objasnění procesů, probíhajících při

jednotlivých experimentech, zobrazujících se na obrazovce monitoru počítače propojeného se systémem AB2 jako záznam intenzity luminiscence. Získané záznamy by bylo možné rozdělit do dvou skupin. Na záznamy získané za použití katalyzátoru a záznamy roztoků bez katalyzátoru. Každá tato skupina záznamů je reprezentována luminiscenční křivkou, charakterizující procesy probíhající v dané skupině roztoků.

3.4.1.1 Záznamy s použitím katalyzátoru

Ve sledovaném roztoku obsahujícím Luminol v bazickém prostředí NaOH je možno pozorovat a měřit intenzitu luminiscenčního záření po dobu, kdy z Luminolu vznikají volné radikály po jeho okysličení peroxidem vodíku (na Obr. 3.1 je to reprezentováno úsekem mezi bodem P a bodem 1). Přítomnost katalyzátoru v roztoku se projeví ostrým píkem. V jeho přítomnosti je Luminol rychle přeměněn na radikálovou formu a reakce vzniku volných radikálů je tak ukončena téměř ve stejném okamžiku, jako byla vybuzena peroxidem.



Obr.3.1: Časová závislost intenzity chemiluminiscence luminolu v roztoku s katalyzátorem; v bodě 0 zaznamenán průběh základní linie měřeného roztoku, v němž je přítomen Luminol, NaOH a katalyzátor; v bodě P nadávkován roztok peroxidu; v bodě 1 je uvolněné množství radikálů maximální a je dosaženo maxima intenzity luminiscence

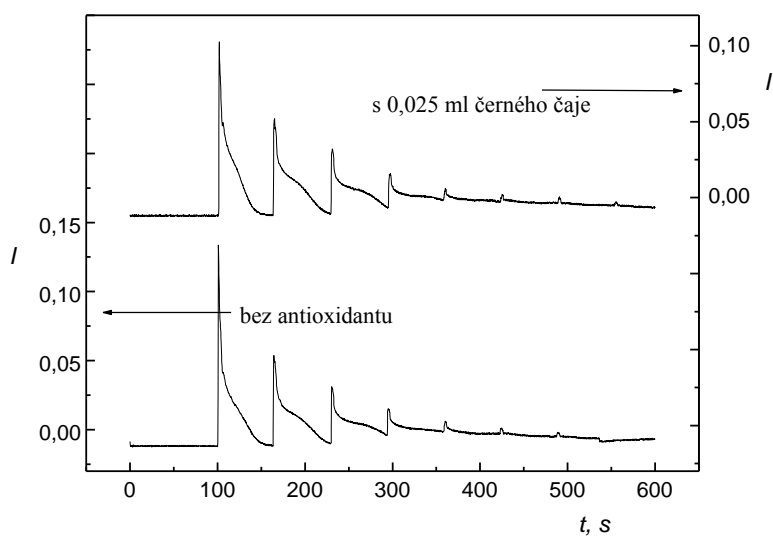
Jak už bylo dříve naznačeno, použití katalyzátoru pro stanovení TAA se ukázalo být nemožné. Reakce vzniku volných radikálů doprovázená měřitelným luminiscenčním zářením

začala a skončila téměř ve stejném okamžiku, neboť přeměna na volné radikály proběhla velmi rychle. Zejména proto, že přítomný katalyzátor byl schopen katalyzovat reakci v jednom velice krátkém okamžiku, a to i po té, co byl přidán do roztoku několikanásobně naředěný.

Přítomné antioxidanty tak byly „postaveny mimo hru“, respektive bylo jim znemožněno se reakce zúčastnit ještě před jejím ukončením, neboť nebyly „dostatečně rychlémi antioxidanty“. Jejich TAA se na luminiscenční křivce vůbec neprojevila a nebyla tedy měřitelná. Názorná ukázka je zobrazena na Obr.3.2.

V obou dvou případech je v bazickém roztoku 0,1% ního Luminolu přítomno 10 μ l 0,01M roztoku katalyzátoru CuSO_4 a do roztoku je v pravidelných časových intervalech přidáván 3% ní roztok peroxidu vodíku.

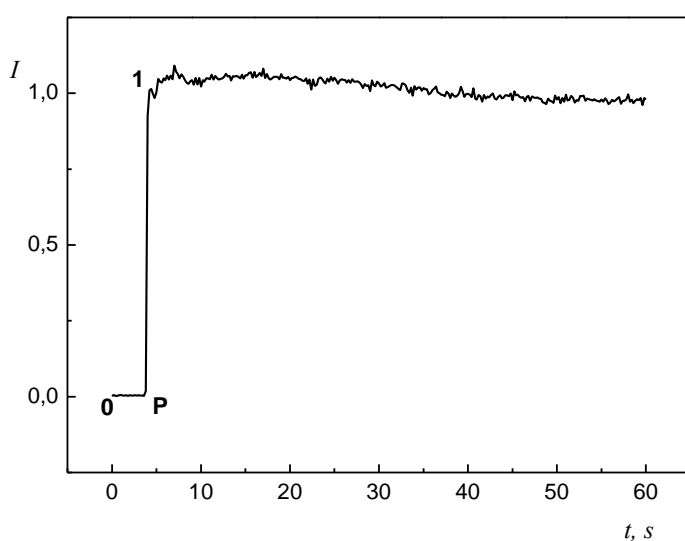
První křivka znázorňuje situaci s přítomností látky s antioxidační aktivitou, druhá křivka představuje situaci, kdy není látka s antioxidační aktivitou v roztoku přítomna. Jak je z přímých záznamů patrné, přítomnost látky s antioxidační aktivitou se na křivce viditelně neprojeví.



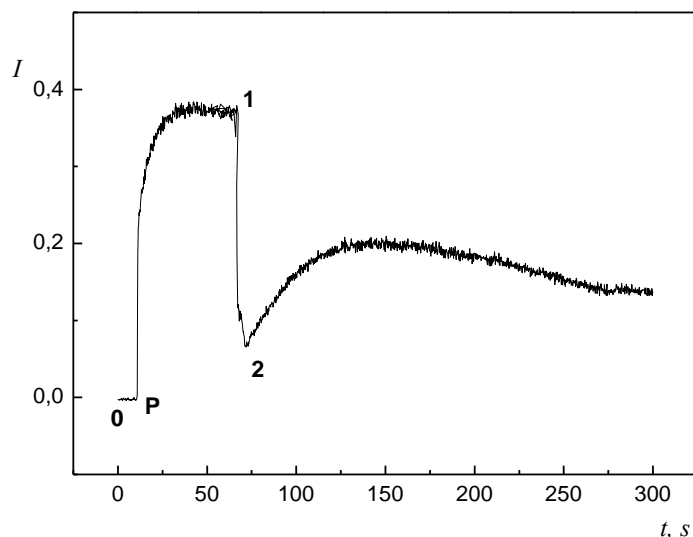
Obr.3.2: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na přidávaném H_2O_2 do 1,5 ml 0,1% roztoku Luminolu v 0,1M NaOH s **přítomností a bez přítomnosti 0,025 ml antioxidantu černého čaje**; 0,025 ml 3% ního roztoku peroxidu přidáváno v pravidelných časových intervalech

3.4.1.2 Záznamy bez použití katalyzátoru

Jelikož využitelným záznamem pro stanovení TAA se ukázaly být pouze záznamy bez katalyzátoru, nadále se soustředila pozornost pouze na tyto záznamy. Chemiluminiscenční křivky bez použití katalyzátoru byly proměřovány za dvojích podmínek. Bez přítomnosti látky s antioxidačním účinkem v roztoku a s její přítomností. Názorně jsou tyto křivky zobrazeny na Obr.3.3 a Obr.3.4. Jedná se o reprezentativní záznamy získané ze spektrofleurimetru AB2.



Obr.3.3: Časová závislost intenzity chemiluminiscence v roztoku luminolu s NaOH bez katalyzátoru a bez přítomnosti antioxidantu; v bodě P je nadávkován peroxid, v bodě 1 je dosaženo maxima uvolněných radikálů a maximální intenzity; v bodě 0 je zaznamenán průběh základní linie měřeného roztoku, v němž je přítomen pouze Luminol a NaOH



Obr.3.4: Časová závislost intenzity chemiluminiscence v roztoku bez katalyzátoru s přítomností antioxidantu; v bodě 0 je zaznamenán průběh základní linie měřeného roztoku, v němž je přítomen Luminol a NaOH, v bodě P je nadávkován peroxid; v bodě 1, kde je dosaženo maxima uvolněných radikálů a intenzity, je nadávkován roztok s antioxidantem; velikost poklesu intenzity až do bodu 2 je úměrná antioxidační aktivitě sledované látky

Záznamy bez přítomnosti antioxidantu se uplatnily při zjišťování vhodných koncentrací a množství některých chemikálií potřebných k proměření kalibrační křivky Troloxu (Obr.3.5 až Obr.3.9). U těchto záznamů byla zjišťována především maximální intenzita luminiscence v bodě 1 (Obr.3.3 a Obr.3.4) představující maximum uvolněných radikálů a luminiscenčního záření.

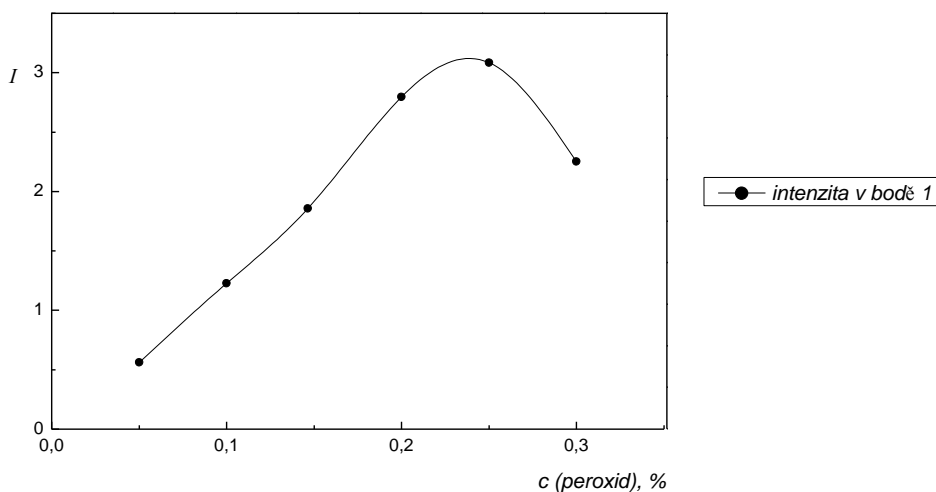
U záznamů s přítomností vzorků s antioxidanty bylo nejprve potřebné zjistit, který úsek luminiscenční křivky je nejvhodnější k určování a porovnávání celkových antioxidačních aktivit vzorků pomocí TEAC. Porovnávala se intenzita luminiscence před a po přidání antioxidantu ve stěžejních bodech na luminiscenční křivce. Z provedených pokusů bylo zřejmé, že nejvhodnějším úsekem na křivce pro určování TAA je vzdálenost mezi body 1 a 2 (Obr.3.4), definující okamžitý pokles intenzity luminiscenčního záření po přidání antioxidantu k roztoku obsahujícímu v daném okamžiku maximum volných radikálů, tedy definující maximální antioxidační aktivitu dané látky. Tato vzdálenost byla zvolena jako parametr pro porovnávání velikostí TAA jednotlivých vzorků pomocí TEAC (Obr.4.1)

3.4.2 Stanovení experimentálních podmínek pro měření kalibrace Troloxu

Aby bylo možno proměřit kalibrační závislost, bylo nejprve nutné zjistit vhodné koncentrace a objemy roztoků zúčastněných látek ovlivňujících tuto závislost. Při všech následujících měřeních byla vždy připravena řada roztoků obsahujících 1,5 ml roztoku Luminolu v 0,1M NaOH. Do přístroje byla vždy vložena kyveta s tímto roztokem a za stálého míchání bylo zahájeno měření emitovaného záření vlnové délky 425 nm. Po 6 s byl dávkován peroxid. Každý z roztoků byl proměřován okamžitě po jeho připravení, přidaný peroxid tak byl čerstvý a účinný.

3.4.2.1 Koncentrace peroxidu vodíku

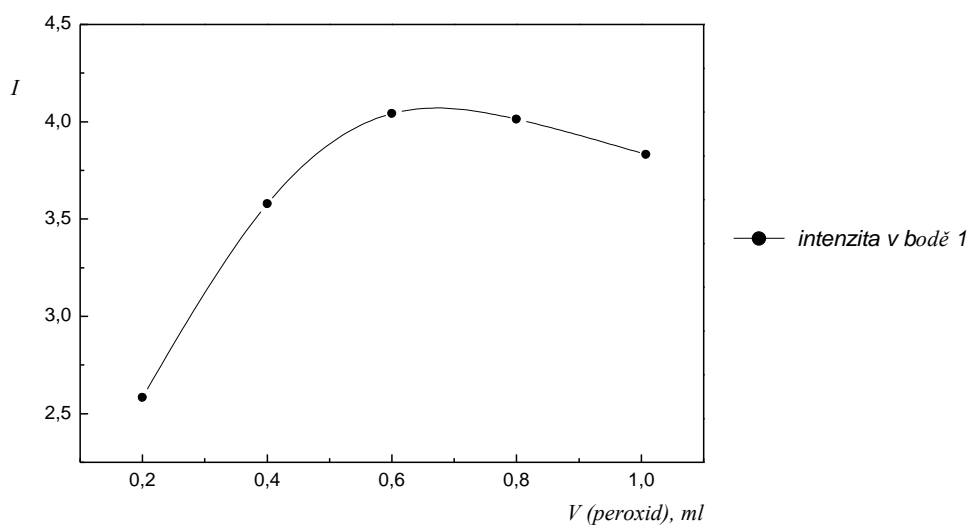
Pro stanovení byl použit 1% ní roztok Luminolu. Do každého proměřovaného roztoku bylo dávkováno 0,4 ml peroxidu o předem určené koncentraci. Po dosažení maxima intenzity luminiscence byla hodnota v bodě 1 na luminiscenční křivce odečtena a zanesena do grafu. Z grafu na Obr.3.5 je patrné, že maxima intenzity je dosaženo u koncentrace 0,25 %. Tato koncentrace peroxidu byla použita pro další měření.



Obr.3.5: Graf závislosti maximální intenzity chemiluminiscence na různé koncentraci peroxidu; v měřených roztocích je obsaženo 1,5 ml roztoku 1% ního Luminolu v 0,1M NaOH a 0,4 ml různě koncentrovaného peroxidu

3.4.2.2 Objem peroxidu vodíku

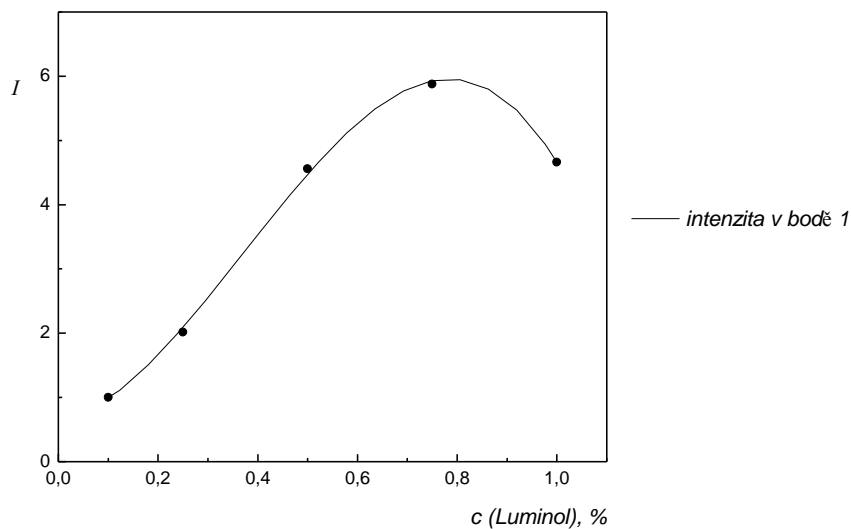
Pro měření byl použit 1% ní roztok Luminolu. Maximum intenzity se objevilo při nadávkování 0,6 ml, jak je vidět na Obr.3.6. Toto množství bylo dále použito..



Obr.3.6: *Graf závislosti maxim intenzity chemiluminiscence na objemu přidaného 25% ního roztoku peroxidu do 1,5 ml roztoku 1% ního Luminolu v 0,1M NaOH*

3.4.2.3 Koncentrace Luminolu

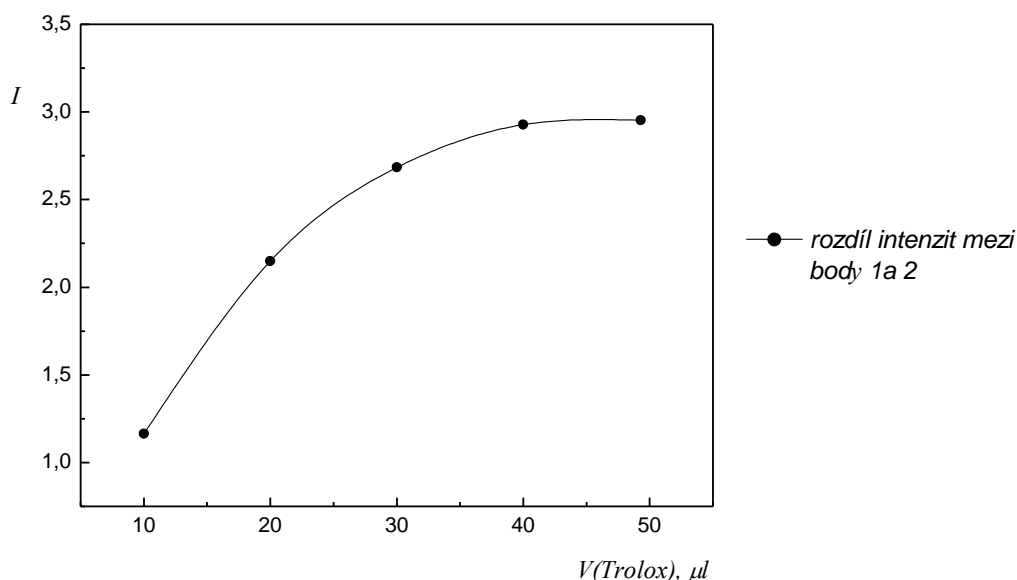
Do každého roztoku bylo dávkováno 0,6 ml 25% ního peroxidu. Nejlépe využitelnou se ukázala být koncentrace Luminolu 0,75% (Obr.3.7).



Obr.3.7: *Graf závislosti maxim intenzity chemiluminiscence na koncentraci Luminolu; do 1,5 ml roztoků různě koncentrovaného Luminolu v 0,1M NaOH je dávkováno 0,6ml 25% ního roztoku peroxidu*

3.4.2.4 Objem Troloxu

Do každého roztoku s 0,75% ním luminolem bylo dávkováno 0,6 ml 25% ního peroxidu. Při dosažení maxima intenzity luminiscence v bodě 1 po nadávkování peroxidu bylo do kyvety s roztokem injektováno předem stanovené množství 1mM Troloxu (zásobní roztok). Po poklesu intenzity na minimum (bod 2 Obr.3.4), úměrnému celkovému úbytku luminiscenčního záření a celkové TAA Troloxu, byla zjištěna a zaznamenána vzdálenost mezi body 1 a 2. To bylo provedeno i s ostatními roztoky s rozdílným množstvím Troloxu. Maximálního rozdílu luminiscence bylo dosaženo při nainjektování 0,5 ml Troloxu (Obr.3.8).

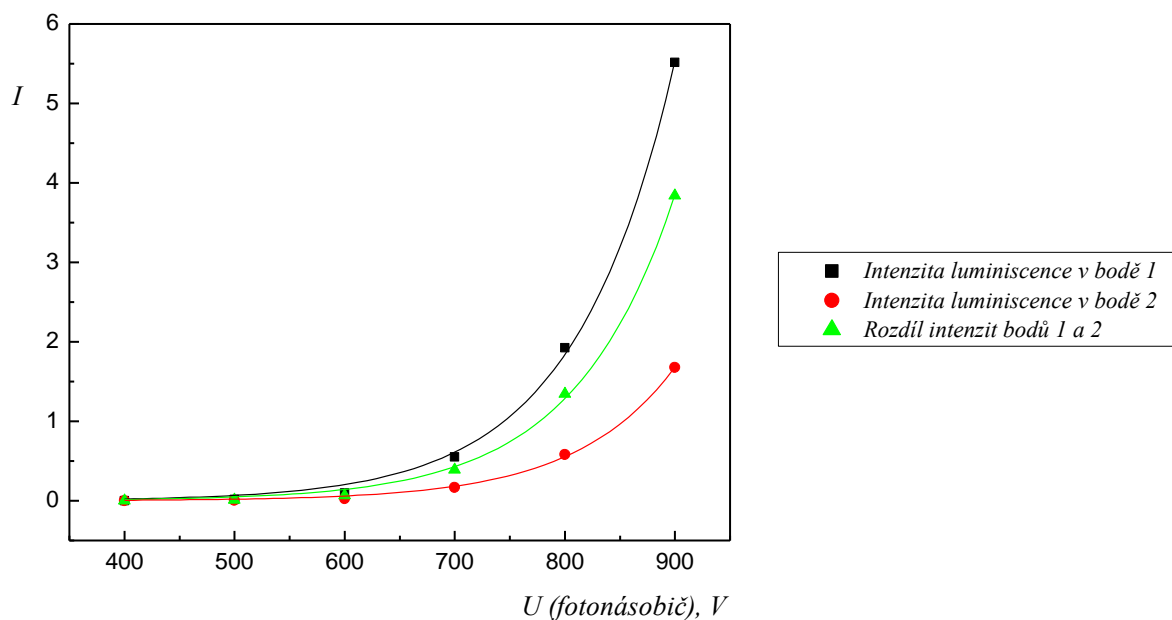


Obr.3.8: *Graf závislosti rozdílu intenzit chemiluminiscence mezi body 1,2 na přidávaném množství Troloxu; v měřených roztocích je obsaženo 1,5 ml roztoku 0,75% Luminolu v 0,1M NaOH, do každého roztoku je během měření nadávkováno 0,6 ml 25% peroxidu a při dosažení maxima intenzity příslušné množství 1mM Troloxu; rozdíl mezi body 1,2 (maximum a minimem intenzity luminiscence) je úměrný TAA*

3.4.2.5 Napětí fotonásobiče

Při napětích fotonásobiče 400V, 500V, 600V, 700V, 800V a 900V byly proměřeny a porovnány chemiluminiscenční křivky 0,75% roztoku Luminolu s 0,1M NaOH s přidávanými 0,6 ml 25% peroxidu a 0,05 ml 1mM Troloxu. Pro měření kalibrační závislosti bylo vybráno

nejefektivnější napětí 900V, kdy rozdíl mezi maximem a minimem intenzity na luminiscenční křivce (mezi body 1,2), je největší(Obr.3.9). Toto napětí se vyznačuje největším poměrem signál/šum a tedy i nejnižší LOD a LOQ.

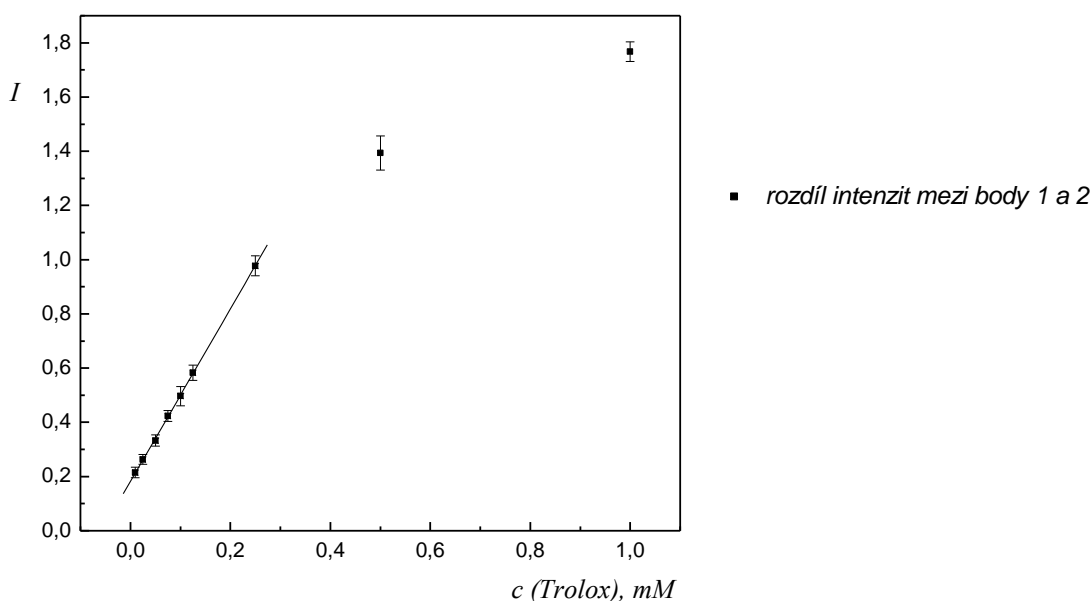


Obr.3.9: *Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na různém napětí vloženém na fotonásobič; v proměřovaném roztoku je obsaženo 1,5 ml roztoku 0,75% Luminolu v 0,1M NaOH; při každém napětí fotonásobiče je k roztoku přidáno 0,6 ml 25% peroxidu a po dosažení maxima intenzity je nadávkováno 0,5 ml 1mM Troloxu; v grafu jsou znázorněny výsledné intenzity a jejich rozdíly*

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

4.1 Měření kalibrační závislosti Troloxu

Po zjištění experimentálních podmínek pro měření kalibrační závislosti Troloxu zbývalo jen tuto závislost proměřit. Byla připravena řada roztoků obsahujících 1,5 ml 0,75% Luminolu s 0,1M NaOH, do každého bylo dávkováno 0,6 ml 25% ního peroxidu a 0,05 ml různě koncentrovaného Troloxu analogickým postupem jako při předchozích dvou stanoveních. Byl aplikován Trolox o koncentracích 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM . S každým roztokem obsahujícím jednu z definovaných koncentrací Troloxu byla provedena tři měření a výsledné průměrné hodnoty intenzit byly zaneseny do grafu. Jak je z obrázku 4.1 patrné, lineární úsek na křivce představuje oblast v rozsahu koncentrací nadávkovaného Troloxu 25 – 250 μM . Tento úsek byl použit pro kalibraci.



Obr.4.1: *Graf závislosti rozdílu intenzit chemiluminiscence mezi body 1 a 2 na koncentraci přidávaného Troloxu; měřené roztoky obsahují 1,5 ml roztoku 0,75% Luminolu v 0,1M NaOH, do každého roztoku je během měření nadávkováno 0,6 ml 25% peroxidu a při dosažení maxima intenzity 0,05 ml různě koncentrovaného Troloxu;*

4.2 Mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny na základě 10 měření s roztokem obsahujícím Trolox o koncentraci 0,01mM. Hodnoty rozdílů intenzit 1,2 byly pomocí rovnice kalibrační přímky přepočítány na koncentrace a ze směrodatné odchylky σ byla vypočítána mez detekce (3σ) a mez stanovitelnosti (10σ). Opakovatelnost byla stanovena při koncentraci roztoku Troloxu 0,1mM jako 2,8 násobek směrodatné odchylky po vyloučení odlehlých výsledků. Citlivost byla určena jako směrnice kalibrační přímky.

Tab. 4.1: *Základní charakteristiky spektrofluorimetrického stanovení TAA Troloxu*

mez detekce LOD (μM)	4,5
mez stanovitelnosti LOQ (μM)	15,0
opakovatelnost	0,41%
citlivost ($\text{dm}^3 \cdot \text{mmol}^{-1}$)	3,184
lineární rozsah metody (μM)	15,0 – 250

4.3 Měření reálných vzorků

Pro měření reálných vzorků byly použity stejné experimentální podmínky, k jakým se dospělo při optimalizaci podmínek pro měření kalibrační křivky Troloxu. Měření se provádělo při optimálním napětí 900V, zbylé podmínky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab.4.2 *Optimální podmínky pro měření reálných vzorků*

Použitá látka	c (%)	V (ml)
luminol (v 0,1M NaOH)	0,75	1,5
peroxid	25	0,6
vzorek antioxidantu	různá	0,05

Postup při měření TAA vzorků byl analogický jako při měření závislosti TAA Troloxu. Namísto různě koncentrovaného roztoku umělého antioxidantu Troloxu byly aplikovány různě koncentrované roztoky vzorků antioxidantů. Každý roztok vzorku byl několikrát naředěn tak, aby jeho výsledná intenzita mezi body 1 a 2 byla v rozmezí rozdílů intenzit kalibrační přímky. Pomocí metody TEAC pak bylo možno porovnat TAA standardu

Troloxu s TAA vzorku antioxidantu. Do rovnice kalibrační přímky Troloxu byly za y dosazeny hodnoty rozdílů intenzit mezi body 1 a 2 všech měřených vzorků antioxidantů a dopočtena jejich koncentrace, odpovídající hodnotám na ose x , v jednotkách koncentrace Troloxu mmol.l^{-1} . Tato hodnota byla poté přepočtena na jednotky Troloxu mg.ml^{-1} či mg.g^{-1} v závislosti na konzistenci studované látky s antioxidačním účinkem.

Rovnice kalibrační přímky Troloxu

$$y = 3,18425x + 0,18439$$

S každým upraveným vzorkem byla provedena 3 měření. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a jako výsledná hodnota byla použita průměrná hodnota každého vzorku.

4.3.1 Měření TAA čajových extraktů

Všechny čajové druhy (White Tea, Zen Chai, Yellow Label, Sayonara) byly připraveny podle návodu (příprava viz 3.2). Připravené čajové roztoky musely být dvacetkrát naředěny, aby se vešly do rozsahu kalibrační přímky.

Tab 4.3: *Obsah antioxidantů ve studovaných čajových extraktech přepočtený na molární a hmotnostní koncentraci Troloxu*

druh čaje	TEAC, mmol.l^{-1}	TEAC, mg.ml^{-1}
White Tea	5,000	1,250
Zen Chai	3,350	0,8380
Yellow Label	3,340	0,8360
Sayonara	1,337	0,3350

4.3.2 Měření TAA piva a vína

Pro měření bylo použito pivo Gambrinus 10° světlý ležák a červené víno Frankovka.

Tab 4.4: *Obsah antioxidantů ve studovaných alkoholických nápojích přepočtený na molární a hmotnostní koncentraci Troloxu*

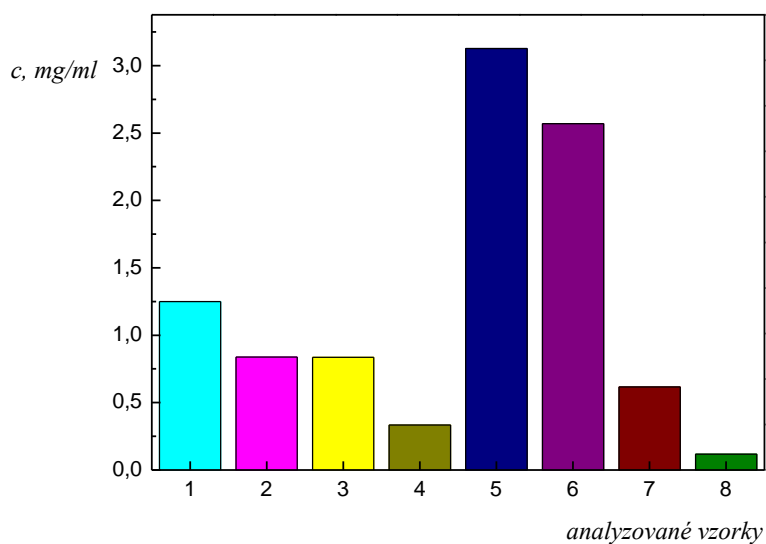
alkoholické nápoje	TEAC, mmol.l^{-1}	TEAC, mg.ml^{-1}
pivo Gambrinus 10°	12,49	3,127
červené víno Frankovka	10,27	2,569

4.3.3 Měření TAA čerstvých šťáv z ovoce

Byly vymačkány čerstvé šťávy z citrónu a kiwi. Pro měření musela být citrónová šťáva naředěna desetkrát, šťáva z kiwi pouze dvakrát.

Tab 4.5: *Obsah antioxidantů ve studovaných ovocných šťávách přepočtený na molární a hmotnostní koncentraci Troloxu*

ovoce	TEAC, mmol.l ⁻¹	TEAC, mg.ml ⁻¹
citrónová šťáva	2,46	0,617
šťáva z kiwi	0,47	0,117



Obr.4.3: *Grafické znázornění a srovnání výsledků hodnot koncentrací antioxidantů ve studovaných nápojích a ovocných šťávách*

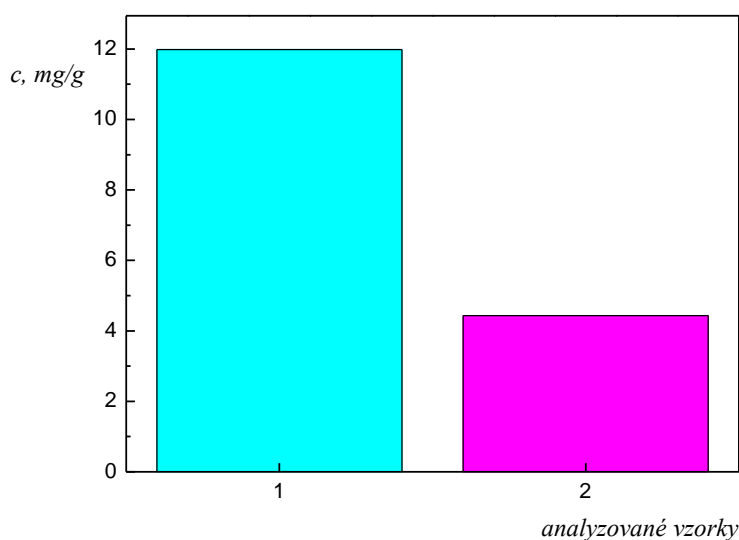
- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 – bílý čaj White Tea | 5 – pivo Gambrinus 10 |
| 2 – zelený čaj Zen Chai | 6 – červené víno Frankovka |
| 3 – černý čaj Yellow Label | 7 – citrónová šťáva |
| 4 – zelený čaj Sayonara | 8 – šťáva z kiwi |

4.3.4 Měření TAA čokolád

Pro měření byla použita 70% ní hořká čokoláda Carla - Czech Choco a 30% ní mléčná čokoláda Carla - Czech Choco. Přibližně 6,9 g na jemno nasekaných čokoládových hoblin (6,8941 g hořké a 6,9149 g mléčné čokolády) bylo extrahováno ve 100 ml deionizované vody. Čokoládové extrakty byly proměřeny po jejich zředění. Extrakt hořké čokolády byl naředěn patnáctkrát, extrakt mléčné čokolády pětkrát.

Tab 4.6: Obsah antioxidantů ve studovaných čokoládách přepočtený na molární koncentraci Troloxu a hmotnost Troloxu na 1g čokolády

čokolády	TEAC, mmol.l ⁻¹	TEAC, mg.g ⁻¹
hořká čokoláda Carla	3,30	11,984
mléčná čokoláda Carla	1,23	4,433



Obr.4.4: Grafické znázornění a srovnání výsledků hodnot koncentrací antioxidantů ve studovaných čokoládách

1 – hořká čokoláda Carla

2 – mléčná čokoláda Carla

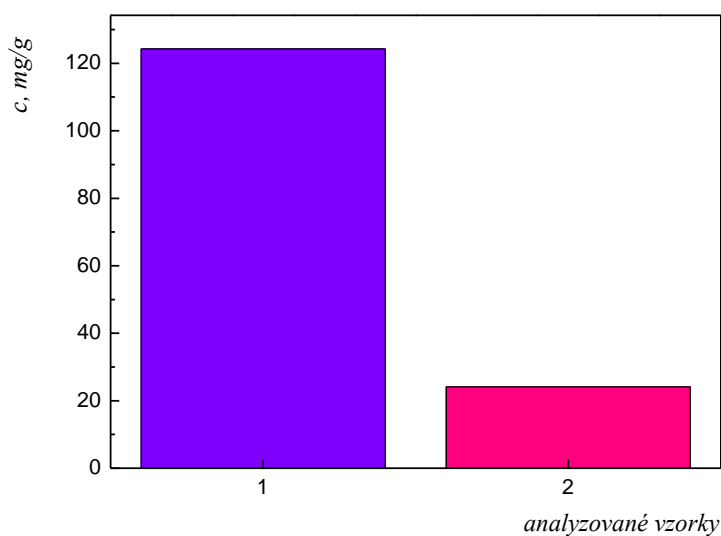
4.3.5 Měření TAA syntetických antioxidantů

K měření byly použity 1 tableta s antioxidanty od firmy Green-Swan Pharmaceuticals a 1 tableta s antioxidanty od firmy Walmark. Každá z tablet byla rozpuštěna ve 100 ml

deionizované vody. Pro měření byl použit padesátkrát zředěný roztok tablety firmy Green-Swan Pharmaceuticals a desetkrát zředěný roztok tablety Walmarku.

Tab 4.7: *Obsah antioxidantů ve studovaných potravinových doplňcích přepočtený na molární koncentraci Troloxu a hmotnost Troloxu na 1 tabletu*

syntetické antioxidanty	TEAC, mmol.l⁻¹	TEAC, mg/tab	TEAC,mg/tab podle výrobce
GS vitamín E, selen, zinek	4,97	124,3	115,05
Walmark Antioxidant	0,96	24,1	67,575



Obr.4.5: *Grafické znázornění a srovnání výsledků hodnot koncentrací antioxidantů ve studovaných čokoládách*

1 – GS vitamín E, selen, zinek

2 – Walmark Antioxidant

5 DISKUZE A ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

S využitím nově vyvinuté metody využívající luminiscenci luminolu pro stanovení TAA metodou TEAC bylo proměřeno celkem 12 vzorků zahrnujících potravinové doplňky (komplex vitamínu E, selen, zinek od firmy Green-Swan Pharmaceuticals, komplex Antioxidant firmy Walmark), 70% ní hořkou a 30% ní mléčnou čokoládu, nápoje (světlé pivo Gambrinus 10°, červené víno Frankovka, bílý čaj White Tea Teekanne, zelený čaj Zen Chai Teekanne, zelený čaj Sayonara, černý čaj Yellow Label Lipton) a čerstvé šťávy z citrónu a kiwi.

Během vyvíjení této metody se dospělo k poznatku, že použití katalyzátoru, jež je u metod využívajících luminiscenci luminolu často uváděno, není vhodné pro stanovení TAA. Za přítomnosti katalyzátoru byl totiž vznik volných radikálů doprovázený luminiscenčním zářením tak rychlý, že přítomným antioxidantům nebylo umožněno zasáhnout do reakce během intervalu, v němž byla luminiscence měřitelná. Z několika provedených pokusů se dalo usoudit, že i přes přítomnost antioxidantů se do roztoku rychle uvolnilo maximální množství volných radikálů.

V testovaném zeleném čaji Zen Chai je obsažena příměs manga a citrónu, pravděpodobně proto je jeho antioxidační aktivita o málo nižší, než by se u zeleného čaje dalo očekávat. Naopak z dosažených výsledků je vidět, že v černém čaji Yellow Label jsou antioxidanty zastoupeny v hojnějším množství, než by se u černého čaje dalo předpovídat. Respektive antioxidační aktivita zeleného čaje Zen Chai a černého čaje Yellow Label je podle výsledků srovnatelná. Zelený čaj Sayonara se umístil se svojí antioxidační aktivitou v závěsu za ostatními čaji, což je u zeleného čaje nestandardní. Podle firmy prodávající tento čaj se jedná o zvláštní druh zeleného čaje, mající široké spektrum účinků. Výluh z tohoto čaje byl velmi slabý, jeho antioxidační aktivita by byla pravděpodobně větší při zvýšení doporučené dávky pro jeho přípravu. Jednoznačně nejvyšší antioxidační aktivitu z měřených čajů prokázal bílý čaj (Teekanne). Bílý čaj je v poslední době horkou novinkou na trhu i ve výzkumu. Zájem vědců vzbuzuje nejen díky vysokému obsahu flavonoidu epigalokatechin-3-galátu, nejvíce se podílejícímu na celkové antioxidační aktivitě, ale i díky obsahu dalších látek se širokým spektrem účinků.

Prekvapivé zjištění se objevilo po proměření TAA piva a vína, kdy světlé pivo Gambrinus 10° předčilo svou antioxidační aktivitou červené víno. O červeném víně je známo, že poskytuje vysokou oxidační aktivitu díky hojně obsaženému polyfenolu

resveratrolu. Jak se však ukázalo, polyfenoly přítomné v pivu mohou svými antioxidačními vlastnostmi účinky červeného vína ještě překonat.

Předpokládaná vysoká antioxidační aktivita hořké čokolády byla měřením potvrzena. Mnohé vědecké studie poukazují na to, že kakaová hmota obsahuje vysoké procento polyfenolů, zhruba 1,5 - 6 procent.³² Naměřené množství antioxidantů přibližně 12 mg na 1 g čokolády ve studované 70% ní čokoládě souhlasí s těmito poznatky. Opomenout nelze ani výsledné množství 4,4 mg antioxidantů na 1 g v 30% ní mléčné čokoládě.

Čerstvě vymačkané šťávy z citrónu a kiwi neprokázaly tak vysokou antioxidační účinnost jako ostatní sledované vzorky. Je obecně známo, že v těchto druzích ovoce je značné množství vitamínu C, zejména v kiwi. Podle výsledků měření však antioxidační účinky vitamínu C byly poměrně nižší než jejich polyfenolických kolegů. Pozoruhodný je i fakt, že kiwi prokázalo asi šestkrát nižší antioxidační aktivitu než citrón. Nabízí se řada vysvětlení. Například, že kiwi obsahuje další látku, která jeho antioxidační aktivitu ruší, či jsou v citrónu složky, které zvyšují jeho antioxidační aktivitu. Je též možné, že stanovení TAA bylo narušeno určitým chemickým individuem přítomným v jednom nebo obou druzích ovoce.

Při porovnání výsledků všech studovaných přírodních vzorků lze konstatovat, že vysokou antioxidační aktivitou disponuje zejména čokoláda s vysokým podílem kakaové sušiny, pivo, červené víno a bílý čaj. Zanedbatelné nejsou ani výsledky u zeleného a černého čaje. Je nutno podotknout, že získané výsledky nelze aplikovat na všechny druhy hořkých čokolád, světlých piv, červených vín, bílých, zelených a černých čajů. Antioxidační aktivita každého z nich je závislá na mnoha faktorech, jako například na odrůdě kakaovníku, vinné révy, chmelu, čajovníku nebo na podmínkách, při kterých byla rostlina vypěstována. Také je důležité, zda jsou v produktu obsaženy příměsi či je čistý.

Ze syntetických antioxidantů byl pro měření vybrán komplex vitamínu E, selenu a zinku od firmy Green Swan Pharmaceuticals a přípravek Antioxidant firmy Walmark. U prvně jmenovaného přípravku byla zjištěna celková antioxidační aktivita velmi blízká té, kterou uvádí výrobce, a to poměrně vysoká, zejména díky vysokému obsahu silného antioxidantu vitamínu E. V případě druhého produktu však bylo naměřeno celkové množství antioxidantů téměř trojnásobně nižší, než uvádí výrobce.

6 ZÁVĚR

Nově vyvinutou metodou pro stanovení TAA založenou na měření úbytku intenzity luminiscence luminolu byla převedením na množství Troloxu stanovena celková antioxidační aktivita celkem 12 vzorků, zahrnujících vzorky přírodních i syntetických antioxidantů. Získané hodnoty byly vzájemně porovnány. Mezi přírodními antioxidanty byla zjištěna dominantní antioxidační aktivita u vzorků hořké čokolády, piva, červeného vína a bílého čaje. U potravinových doplňků se syntetickými antioxidanty byla naměřená antioxidační aktivita porovnána s hodnotami poskytnutými výrobcem. U jednoho ze dvou studovaných syntetických přípravků se antioxidační aktivita značně lišila od teoretické hodnoty, u druhého se shodovala s údaji poskytnutými výrobcem. Druhý syntetický vitamínový doplněk se navíc prokázal vysokým obsahem antioxidantů. I přesto lze však říci, že vzhledem k množství, v jakém jsou výše uvedené přírodní antioxidanty běžně konzumovány, jsou ve srovnání s jejich syntetickými kolegy nezastupitelné. Navíc přírodních antioxidantů existuje velké množství různých druhů a spektrum jejich účinků je velmi široké.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

-
- ¹ RACEK, J. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění, nakl. GALÉN, 2003
- ² RE, R., PELLEGRINI, N. et al. Free Radical Biology and Medicine, 1999, no. 26, p. 1231
- ³ DARLEY-USMAR, V., HALLIWELL, B. Blood radicals. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions and vascular system. Pharm. Res., 1996, no.13, p. 649-662
- ⁴ COOKE, MS., EVANS, MD. et al. Role of the dietary antioxidants in the prevention of in vivo oxidative DNA damage. Nutrition Res. Rev., 2002, no. 15, p. 19-41
- ⁵ Reilly, P.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Amer.J.Surg* **161**, 488-503 (1991)
- ⁶ ŠTÍPEK, S. et al. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, Praha: Grada Publishing, 2000, 295s
- ⁷ WATER, R. O antioxidantech, nakl. PRAGMA, 2002, 33s - 44 -
- ⁸ COOKE, MS., EVANS, MD. et al. Role of the dietary antioxidants in the prevention of in vivo oxidative DNA damage. Nutrition Res. Rev., 2002, no. 15, p. 19-41
- ⁹ Y.H. Hui, David Kitts, Peggy S. Stanfield, Foodborne Disease Handbook, Second Edition, Volume 4: Seafood and Environmental toxins, 2000, p.495
- ¹⁰ Fereidoon Shahidi, Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications-Medical, AOCS Press 1997, p.1-270
- ¹¹ Parnes, Robin Brett. "How Antioxidants Work." 26 November 2002. HowStuffWorks.com. <<http://health.howstuffworks.com/life-stages/aging/antioxidant.htm>> 01 September 2009.
- ¹² Jana Parkányiová, Lucie Parkányiová, Jan Pokorný „Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů“ Ústav chemie a analýzy potravin, FPBT, VŠCHT Praha <www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_30C.doc> ; cit. 20.8.2009
- ¹³ Dudjak J., Jandová G., Faitová K., Lachman J., Pivec V., Hejtmánková A: Obsah celkových polyfenolů a rutinu v různých typech mlynářských výrobků z pohanky seté (*Fagopyrum esculentum* Moench.), p.39 <http://www.vscht.cz/zkp/ustav/doc/SbSD03.doc>; cit. 20.8.2009

¹⁴ Pharm.Dr.Tomáš Arndt (2008) - Vitamin E (tocoferol aceticum, tokoferol)
<http://www.celostnimedicina.cz/vitamin-e-tocoferolum-aceticum-tokoferol.htm>;
cit. 20.8.2009

¹⁵ Mgr. Lucie Mandelová, Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci,
Brno, 2006, 166 s

¹⁶ Richard Hampl, Oldřich Lapčík, Jíte rádi flavonoidy?: Vesmír 75, 125, 1996/3

¹⁷ Chen, C., Blumberg, J. 2009. Flavonoids in Beer and Their Potential Benefit on the Risk of Cardiovascular Disease. In: Preedy, V.R., Watson, R., editors. Encyclopedic Handbook of Beer in Health and Disease Prevention. Burlington, MA: Academic Press-Elsevier. p. 831-841

¹⁸ Ariefdjohan M.W., Savaiana D.A.(2006) Chocolate and cardiovascular health: is it good to be true? Nutrition Reviews, Dec., 63 (12 Pt 1) 427-30

¹⁹ Ding E.L., Hutfless S.M. a další (2005) Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A. Systematic Review. Nutrition Metabolism (Lond) 3;3.2.

²⁰ Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S et al. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F-2-isoprostane concentrations in humans. Free Radical Biology and Medicine, 37: 411-421.

²¹ Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T et al. Dark Chocolate Consumption Increases HDL Cholesterol Concentration and Chocolate Fatty Acids May Inhibit Lipid Peroxidation in Healthy Humans. Free Radic.Biol.Med., 37: 1351-1359

²² Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. Curr.Opin.Lipidol., 13: 41-49

²³ Sevn A, Oztas P, Senen D, Han U, Karaman C, Tarimci N, Kartal M, Erdogan B: Effects of polyphenols on skin damage due to ultraviolet A rays: an experimental study on rats. Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology. 21(5):650-656, May 2007

²⁴ Paulová, H.; Bochořáková, H.; Tábořská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chem. Listy 98, 174-179 (2004)

²⁵ Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody I. Praha, Nakladatelství Karolinum 2004

²⁶ Ondřej Šimůnek: Chemiluminiscence pdf. 2008
http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf; cit. 20.8.2009

-
- ²⁷ 3- Aminophthalhydrazide(Luminol), VUOS/Produkty
http://www.vuosas.cz/cz/produkty/3_aminophthalhydrazide_luminol; cit. 20.8.2009
- ²⁸ Chemiluminescence: Synthesis of Luminol Chem 197 - Spring 1998
<http://cas.bellarmin.edu/chem117a/lab/luminol.htm>; cit. 20.8.2009
- ²⁹ Fluorofory v biomedicině, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>; cit. 20.8.2009
- ³⁰ Harris, Tom. "How Luminol Works." 11 June 2002. HowStuffWorks.com.
<<http://science.howstuffworks.com/luminol.htm>> 02 September 2009
- ³¹ Projekt chemiluminiscence [online]. Ústí nad Labem: Univerzita J.E.Purkyně
posl. úpravy 4.9.2007 [cit. 2007-09-04]. Dostupné na WWW: [http:// projekt-cl.ujep.cz/](http://projekt-cl.ujep.cz/).
- ³² Midori Natsume, Naomi Osakabe, Megumi Yamagishi, Toshio Takizawa, Tetsuo Nakamura, Haruka Miyatake, Tsutomu Hatano and Takashi Yoshida, "Analyses of Polyphenols in Cacao Liquor, Cocoa, and Chocolate by Normal-Phase and Reversed-Phase HPLC", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. **64**, 2581-2587 (2000)